

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
| <b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :</b><br><b>C07K 17/02, C12N 11/02, 9/10, G01N 33/543</b>  |  | <b>A2</b>   | <b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/06446</b><br><b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 11. Februar 1999 (11.02.99)</b> |
| <b>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/04768</b><br><b>(22) Internationales Anmeldedatum: 30. Juli 1998 (30.07.98)</b><br><b>(30) Prioritätsdaten: 197 32 917.9 30. Juli 1997 (30.07.97) DE</b><br><b>(71)(72) Anmelder und Erfinder: FUCHSBAUER, Hans-Lothar [DE/DE]; Fürthweg 1a, D-64367 Mühlthal-Traisa (DE).</b><br><b>(72) Erfinder; und</b><br><b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PASTERNAK, Ralf [DE/DE]; Konrad-Adenauer-Strasse 21, D-64347 Griesheim (DE). EYMANN, Rolf [DE/DE]; Westring 32, D-64354 Reinheim (DE). OTTERBACH, Jens [DE/DE]; Bergstrasse 34, D-69221 Dossenheim (DE). BECHTOLD, Uwe [DE/DE]; Jägertorstrasse 2, D-64291 Darmstadt (DE).</b><br><b>(74) Anwalt: GRÜNECKER, KINDELDEY, STOCKMAIR &amp; SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).</b>  |  | <b>(81) Bestimmungsstaaten: US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</b><br><br><b>Veröffentlicht</b><br><i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> |  |
| <b>(54) Title: METHOD FOR TRANSGLUTAMINASE-CATALYZED COUPLING OF PROTEIN OR PEPTIDE TO A SUPPORT</b><br><b>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM TRANSGLUTAMINASE-KATALYSIERTEN KOPPELN VON PROTEIN ODER PEPTID AN EINEN TRÄGER</b><br><b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to a method for transglutaminase-catalyzed coupling of protein or peptide to a support, while retaining at least 50 % of the biological activity of the protein or peptide. The invention also relates to the immobilized proteins coupled to the support and the support/protein conjugations obtained by this method, as well as to their use. A method already exists for simultaneously immobilizing enzymes with supports by means of transglutaminase-catalyzed coupling. This method is, however, not suitable for enzymes having polymer substrate molecules. Further attempts to bond enzymes with polymer substrates to ion-exchanging materials, and to stabilize them with transglutaminase, resulted in immobilized products with very low activity. The new method enables the production of immobilized proteins coupled to the support and support/protein conjugations, while retaining at least 50 % of the biological activity of the protein or peptide. In accordance with the invention, proteins or peptides are coupled to a support under the effect of transglutaminase. To this end, the support is brought into contact with the protein or peptide that is to be coupled, and with the transglutaminase. The support and the protein act as acyl and/or amine donors, and are suitable for use as transglutaminase substrates.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Transglutaminase-katalysierten Koppeln von Protein oder Peptid an einen Träger unter Erhalt von mindestens 50 % der biologischen Aktivität des Proteines oder Peptides, gemäß diesem Verfahren erhältliche, trägergekoppelte Proteinimmobilisate und Träger-Protein-Konjugate sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergekoppelten Proteinimmobilisate und Träger-Protein-Konjugate. Es ist bereits bekannt, Enzyme mit Trägermaterialien durch Transglutaminase-katalysierte Kopplung simultan zu immobilisieren. Dieses Verfahren ist jedoch für Enzyme mit polymeren Substratmolekülen nicht geeignet. Weitergehende Versuche, Enzyme mit polymeren Substraten an Ionenaustauschermaterial zu binden und mit Transglutaminase zu stabilisieren, hat zu Immobilisaten mit sehr niedriger Aktivität geführt. Das neue Verfahren ermöglicht die Herstellung von trägergekoppelten Proteinimmobilisaten und Träger-Protein-Konjugaten unter Erhalt von mindestens 50 % der biologischen Aktivität des Proteines oder Peptides. Erfindungsgemäß werden Proteine oder Peptide unter Transglutaminase-Einwirkung an einen Träger gekoppelt, indem der Träger mit dem zu koppelnden Protein oder Peptid und mit Transglutaminase in Kontakt gebracht wird, wobei der Träger und das Protein als Acyl- und/oder Amino-donor wirken und als Transglutaminasesubstrat geeignet sind.</p> |  |   |  |

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                      |    |  |    |                                   |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                              | LS | Lesotho  | SI | Slowenien                         |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                             | LT | Litauen  | SK | Slowakei                          |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                           | LU | Luxemburg  | SN | Senegal                           |
| AU | Australien                   | GA | Gabon                                | LV | Lettland   | SZ | Swasiland                         |
| AZ | Aserbaidschan                | GB | Vereinigtes Königreich               | MC | Monaco   | TD | Tschad                            |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                             | MD | Republik Moldau                                    | TG | Togo                              |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                                | MG | Madagaskar   | TJ | Tadschikistan                     |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                               | MK | Die ehemalige jugoslawische<br>Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                      |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                         | ML | Mali   | TR | Türkei                            |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                               | MN | Mongolei   | TT | Trinidad und Tobago               |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                               | MR | Mauretanien  | UA | Ukraine                           |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                               | MW | Malawi   | UG | Uganda                            |
| BY | Belarus                      | IS | Island                               | MX | Mexiko   | US | Vereinigte Staaten von<br>Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                              | NE | Niger  | UZ | Usbekistan                        |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                                | NL | Niederlande  | VN | Vietnam                           |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                                | NO | Norwegen   | YU | Jugoslawien                       |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                          | NZ | Neuseeland   | ZW | Zimbabwe                          |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik<br>Korea | PL | Polen  |    |                                   |
| CM | Kamerun                      | KR | Republik Korea                       | PT | Portugal   |    |                                   |
| CN | China                        | KZ | Kasachstan                           | RO | Rumänien   |    |                                   |
| CU | Kuba                         | LC | St. Lucia                            | RU | Russische Föderation                               |    |                                   |
| CZ | Tschechische Republik        | LI | Liechtenstein                        | SD | Sudan  |    |                                   |
| DE | Deutschland                  | LK | Sri Lanka                            | SE | Schweden   |    |                                   |
| DK | Dänemark                     | LR | Liberia                              | SG | Singapur   |    |                                   |
| EE | Estland                      |    |                                      |    |  |    |                                   |

## **Verfahren zum Transglutaminase-katalysierten Koppeln von Protein oder Peptid an einen Träger**

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Transglutaminase-katalysierten Koppeln von Protein oder Peptid an einen Träger unter Erhalt von mindestens 50 % der biologischen Aktivität des Proteines oder Peptides, gemäß diesem Verfahren erhältliche trägergekoppelte Proteinimmobilisate und Träger-Protein-Konjugate sowie die Verwendung der erfindungsgemäßen trägergekoppelten Proteinimmobilisate und Träger-Protein-Konjugate.

Die kovalente Verknüpfung von Proteinen zu stabilen Aggregaten bzw. ihre kovalente Bindung an Trägermaterialien sind wichtige Verfahren in der Medizintechnik, Lebensmitteltechnik und Diagnostik. Üblicherweise findet die Vernetzung mit chemischen Reagenzien statt, unter denen Glutardialdehyd eine herausragende Rolle spielt. Andere organische Verbindungen mit mindestens zwei reaktiven funktionellen Gruppen (eine Ausnahme stellt Formaldehyd dar) können ebenfalls eingesetzt werden. Eine stabile Bindung läßt sich auch dadurch erreichen, daß ein Protein vor der Kopplung mit einem zweiten Protein chemisch aktiviert wird. Eine gängige Methode ist beispielsweise die Oxidation von Glykoproteinen mit Periodsäure unter Öffnung eines Zuckerrings und Erzeugung reaktiver Carbonylfunktionen. Bei Immobilisierungsverfahren besitzt meistens das Trägermaterial schon eine geeignete reaktive Gruppe für die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Protein und Trägermatrix, z.B. eine Oxirangruppe.

Die Proteinkopplung mit chemischen Vernetzungsmitteln verläuft durch die hohe Reaktivität der funktionellen Gruppen in der Regel unter milden Reaktionsbedingungen, d.h. in neutralem Milieu und bei Raumtemperatur. Diese Verfahrensparameter sind auch notwendig, um eine weitgehende Denaturierung der Biomoleküle und damit einhergehend den Verlust der biologischen Aktivität zu vermeiden. Dennoch läßt sich bei Verwendung chemischer Reagenzien eine Desaktivierung der Proteine nicht verhindern, und in vielen Fällen kommt es zu hohen Verlusten an biologischer Aktivität. Die wesentliche Ursache für den Aktivitätsver-

lust muß in der vollkommen unkontrollierten und unspezifischen Reaktion zwischen chemischem Reagenz und Protein gesehen werden.

Es ist bereits bekannt, daß Transglutaminasen (Protein-Glutamin: Amin- $\gamma$ -glutamyltransferase E.C. 2.3.2.13) den Aufbau stabiler Querbrücken zwischen Proteinen spezifisch katalysieren. Dabei wird die  $\gamma$ -Carboxamidfunktion von Glutaminseitenketten auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysinresten unter Freisetzung von Ammoniumionen übertragen (Folk und Finlayson, Adv. Protein Chem. 31, 1-133 (1977)). Die neu gebildete Isopeptidbindung hält auch einer Hydrolyse durch Proteasen stand und wird physiologisch erst nach vollständigem Abbau der Proteine durch eine  $\gamma$ -Glutamylamin-Cyclotransferase gespalten (Fink et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4564-4568 (1980)).

Transglutaminasen wurden im Stand der Technik bereits zum Immobilisieren von Enzymen verwendet. Beispielsweise beschreibt die JP 59 66 886 ein Verfahren, bei dem Trägermaterial und zu koppelndes Protein zum Herstellen von Proteinimmobilisaten simultan ausgefällt werden (simultanes Immobilisierungsverfahren). Dazu wurden verschiedene Enzyme (Glucoseoxidase, Katalase, Diaphorase, RNase, Glucosidase, Mannosidase, Glutamatdehydrogenase) mit >2% (w/v) Trägermaterial in einer gepufferten Lösung vernetzt. Dieses Verfahren wurde auch erfolgreich zum Herstellen aktiver Caseinmembranen verwendet (JP 61 227 783 und Motoki et al., Agric. Biol. Chem. 51, 997-1002 (1987)), indem die Proteinlösung unmittelbar nach Zugabe der Enzyme auf eine Vinyl- oder Polymethacrylatplatte aufgebracht und an der Luft bei 37-40°C getrocknet wurde. Man erhielt auf diese Weise eine zugfeste Membran oder Folie. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch die geringe spezifische Aktivität des erhaltenen Proteinimmobilisates. Die Immobilisatausbeuten variieren zwischen <1% (Glucoseoxidase) und 30% ( $\beta$ -Galactosidase), bezogen auf die Ausgangsaktivität. Die Abhängigkeit der Immobilisatausbeute von Proteinkonzentration und Quervernetzungsgrad wurde von Fuchsbauer et al. (Biomaterials 17, 1481-1488 (1996)) am Beispiel von  $\beta$ -Galactosidase aus Aspergillus oryzae mit dem Trägerprotein Gelatine untersucht.

Die höchsten Immobilisatarausbeuten (30–46% der Ausgangsaktivität) konnten mit einer 10–15% Gelatinelösung von hoher Gallertfestigkeit, vernetzt mit 2 mE Transglutaminase pro mg Protein, erzielt werden.

Ein weiterer Nachteil des simultanen Immobilisierungsverfahrens ist es, daß dieses nur für Enzyme mit kleinen Substratmolekülen geeignet ist, die ungehindert in die Trägermatrix eindringen können, da die Enzyme in der Matrix eingeschlossen vorliegen. Größere bzw. polymere Substratmoleküle können in die Trägermatrix nicht eindringen, so daß eine enzymatische Reaktion nicht stattfinden kann. Dieses Problem versuchten Kamata et al. (JP 06 46 855 von 1992 und Biosci. Biotech. Biochem. 56, 1323–1324 (1992)) dadurch zu lösen, daß sie Enzyme mit polymeren Substraten (Trypsin,  $\alpha$ -Amylase) an ein Ionenaustauschermaterial banden und anschließend mit Transglutaminase anstelle von Glutardialdehyd stabilisierten. Reaktionsansätze zur Stabilisierung von  $\alpha$ -Amylase-Immobilisaten mit pH-Werten von 6 bis 8 lieferten jedoch trotz sehr hoher Transglutaminasekonzentrationen (280 mE/mg) keine aktiven Immobilisate.  $\alpha$ -Amylase hatte nach einer Immobilisierung an zwei unterschiedlichen Ionenaustauschermaterialien und Transglutaminase-katalysierter Stabilisierung bei pH 4 und pH 9 bis 11 die höchste Restaktivität (1,5–3%). Diese Restaktivität kann wahrscheinlich nicht auf eine Stabilisierung durch Transglutaminase zurückgeführt werden, da Transglutaminase nur im Bereich von pH 5 bis pH 9 aktiv ist. Die Rolle von Transglutaminase bei diesem Verfahren bleibt also unklar.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Proteine oder Peptide unter Erhalt ihrer biologischen Aktivität an einen Träger gekoppelt werden können.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zum Transglutaminase-katalysierten Koppeln von Protein oder Peptid an einen Träger unter Erhalt von mindestens 50 % der biologischen Aktivität des Proteines oder Peptides gelöst, wobei der Träger ein bioaktives Molekül oder eine vorgegebene unlösliche

Matrix ist, umfassend den Schritt des Inkontaktbringens des Trägers mit dem zu koppelnden Protein und mit Transglutaminase, wobei der Träger und das Protein oder Peptid als Acyl- und/oder Amindonor wirken und als Transglutaminase-substrat geeignet sind.

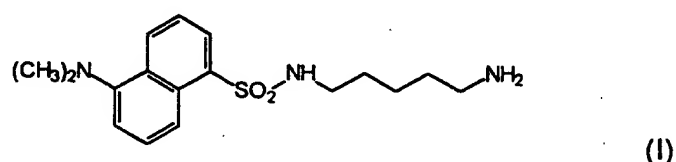
Unter "biologischer Aktivität" des Proteines oder Peptides ist dabei die jeweilige enzymatische Aktivität von Enzymen, die Antikörper-Bindungsaktivität von Antikörpern, die inhibierende Aktivität von Inhibitoren und die Antigenizität von Antigenen zu verstehen. Im Einklang mit dieser Definition können nicht nur vollständige Proteine, sondern auch Proteinfragmente oder Peptide biologisch aktiv sein.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren lassen sich Protein- oder Peptid-Immobilisate und -Konjugate mit allen von einer Transglutaminase akzeptierten Trägern herstellen. Für die Kopplung benötigen Proteine und Peptide Glutamin- und/oder Lysinreste, die für Transglutaminase zugänglich sind. Andere Verbindungen sowie modifizierte Proteine oder Peptide müssen mindestens eine Säureamidfunktion oder eine primäre Amingruppe besitzen. Auch eignen sich Proteine und andere Verbindungen als Ausgangsmaterialien für die enzymatische Vernetzung, wenn diese zuvor durch Verlängerung mit einer Oligo- oder Polyglutaminylkette, einem Glutaminylpeptid, einer Oligo- oder Polylysinkette oder einem primären Amin unter Zuhilfenahme von chemischen und/oder molekularbiologischen Methoden modifiziert worden sind.

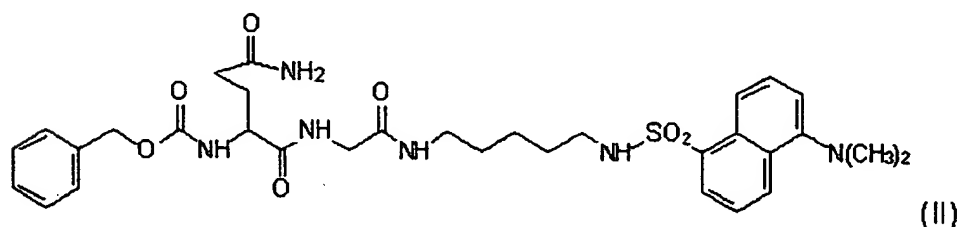
Es wird empfohlen, daß vor der enzymatischen Vernetzungsreaktion mit Transglutaminase alle Reaktionspartner, also der Träger sowie das zu koppelnde Protein oder Peptid, auf ihre Eignung als Enzymsubstrat überprüft werden bzw. Reaktionspartner verwendet werden, deren Eignung als Transglutaminase-Substrat bekannt ist. Die Eignung als Transglutaminase-Substrat kann durch den Einbau von in der Regel fluoreszierenden Transglutaminase-Substraten festgestellt wer-

den. Es wird dabei zwischen Acyl- bzw. Glutamindonoren einerseits und Amindonoren (Glutaminakzeptoren) andererseits unterschieden.

Für den Nachweis reaktiver Carboxamidgruppen kann beispielsweise die von Lorand et al. (Anal. Biochem. 44, 207-220 und 221-231 (1971)) eingeführte fluoreszierende Verbindung 5-N-(5'-N'-N'-Dimethylaminonaphthalinsulfonyl)amidopentylamin verwendet werden. Diese Verbindung weist die folgende Formel (I) auf:



Die Identifizierung reaktiver Amine in einem breit angelegten Screening-Prozeß wurde erst mit der Synthese des Dipeptids 1-N-(Carbobenzoxy-L-glutaminylglycyl)-5-N-(5'-N'-N'-Dimethylaminonaphthalinsulfonyl)diamidopentanon möglich, die 1997 durch Pasternack et al. (Anal. Biochem., 249, 54-60 (1997)) eingeführt wurde. Die Verbindung weist die folgende chemische Formel (II) auf:



Bei Proteinen sollten zwei verschiedene Inkubationsansätze je Protein durchgeführt werden (Beispiel 2). Der eine enthält neben Transglutaminase ein markiertes Amin, z.B., C-DNS(I), das zur Bestimmung reaktiver Glutaminreste geeignet ist, der andere ein markiertes Säureamid, z.B. CBZ-Gln-Gly-C-DNS(II), zur Bestimmung reaktiver Lysinseitenketten.

Die Proteine werden nach der Inkubation elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend durch Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm sichtbar ge-

macht. Um Fehlinterpretationen bei unbekannten oder stark verunreinigten Proteinpräparaten zu vermeiden, wird empfohlen, nach UV-Bestrahlung des Elektrophoresegels und Dokumentation eine Silber- oder Coomassie-Färbung des Gels vorzunehmen. Peptide und andere kleine Moleküle können durch Chromatographie, z.B. analytische HPLC, vom Überschußreagenz getrennt und über ihre Emission als Transglutaminase-Substrat erkannt werden. Prinzipiell lassen sich aber auch radioaktive oder biotinylierte Markierungsreagenzien (z.B. Biotinylamiodopentylamin der Fa. Pierce) für die Vorversuche einsetzen. Der Nachweis einer erfolgreichen Markierung erfolgt dann nach der Auftrennung durch Autoradiographie oder mit Avidin-/Streptavidin-Enzym-Konjugaten.

Unmodifizierte Proteine lassen sich so in vier Kategorien einordnen:

- Glutamindonoren: Proteine mit ausschließlich reaktiven Glutaminresten (Kategorie 1);
- Glutaminakzeptoren: Proteine mit ausschließlich reaktiven Lysinresten (Kategorie 2);
- Glutamindonoren und -akzeptoren: Proteine mit reaktiven Glutamin- und Lysinresten (Kategorie 3);
- Proteine ohne reaktive Glutamin- und Lysinreste im nativen Zustand (Kategorie 4).

Tabelle 1 zeigt beispielhaft wichtige bioaktive Proteine mit reaktiven Seitenketten, die als Transglutaminasesubstrate dienen können. Prinzipiell können mit dem beschriebenen Testverfahren auch andere Biopolymere sowie synthetische Polymere als Transglutaminasesubstrate erkannt werden.



TABELLE 1

| Protein  | Glutamindonor | Glutaminakzeptor |
|--|---------------|------------------|
| Protein A ( <i>Streptococcus aureus</i> )          | +             | +                |
| Protein G ( <i>Streptococcus sp.</i> )             | -             | +                |
| Avidin (Hühnereiweiß)                              | -             | +                |
| Streptavidin ( <i>Streptomyces avidinii</i> )      | +             | +                |
| Glucoseoxidase ( <i>Aspergillus niger</i> )        | +             | +                |
| $\beta$ -Galactosidase ( <i>E. coli</i> )          | +             | +                |
| Sojabohnen-Peroxidase                              | +             | +                |
| Peroxidase ( <i>Arthromyces ramosus</i> )          | +             | +                |
| Lactoperoxidase (Rind)                             | +             | +                |
| Alkalische Phosphatase (Rind)                      | +             | +                |
| $\beta$ -Glucuronidase ( <i>Escherichia coli</i> ) | +             | +                |
| Luziferase   | +             | +                |
| DNase  | +             | +                |

Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit jeder Art von Acyl- und/oder Amindonor durchgeführt werden, vorausgesetzt, dieser ist als Transglutaminasesubstrat geeignet, was, wie oben dargelegt, getestet werden kann. In bevorzugten Ausführungsformen ist das zu koppelnde Protein oder Peptid ein Glutamindonor und der Träger umfaßt reaktive Amingruppen. In einer alternativen Ausführungsform ist das zu koppelnde Protein oder Peptid ein Glutaminakzeptor und der Träger stellt reaktive Carboxamidgruppen zur Verfügung. Im Falle von Proteinen mit reaktiven Glutamin- und Lysinseitenketten kann der Träger Amingruppen oder Carboxamidgruppen oder Amin- und Carboxamidgruppen enthalten. Selbstverständlich kann es sich bei dem Träger auch um ein Protein handeln, so daß die reaktiven Amingruppen des Trägers beispielsweise auch Lysinseitenketten, die

reaktiven Carboxamidgruppen des Trägers reaktive Glutaminseitenketten sein können.

Erfindungsgemäß kann es sich bei dem Träger um ein in Lösung vorliegendes bioaktives Molekül handeln. Bevorzugt ist das bioaktive Molekül ein Enzym. Die Kopplung eines Proteines oder Peptides an ein Enzym dient beispielsweise der Bereitstellung von Molekülen mit zwei unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten. Die Vernetzung zweier Moleküle kann außerdem für die Bereitstellung von Proteindimeren oder höheren Aggregationsformen, die zum Beispiel als Ligand eines Rezeptors eine biologische Aktivität haben, sinnvoll sein. In jedem Fall müssen von mindestens einem Reaktionspartner reaktive Amine und von mindestens einem weiteren Reaktionspartner reaktive Carboxamidgruppen zur Verfügung gestellt werden.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei dem Träger um eine vorgegebene unlösliche Matrix. Die enzymatische Vernetzung von Proteinen, zum Beispiel von Gelatine und Casein, führt zu guten Trägern, die auch bei Temperaturen oberhalb von 100°C stabil bleiben. Vernetzte Proteine sind als unlösliche Matrix bevorzugt.

Das zu koppelnde Protein oder Peptid kann ein natives Protein oder Peptid sein, ein rekombinantes oder ein synthetisch hergestelltes. Weiter kann das zu koppelnde Protein oder Peptid modifiziert oder unmodifiziert vorliegen. Unter Modifikationen sind dabei sowohl Mutationen der Primärstruktur einschließlich von Deletionen und Insertionen sowie Aminosäureaustausche zu verstehen, als auch chemische Modifikationen, wie die nachträgliche PEGylierung, Glykosylierung oder Deglykosylierung, das nachträgliche An- bzw. Einfügen von Cysteinresten etc. Gleiches gilt für den Träger und bezieht sich sowohl auf die unlösliche Trägermatrix als auch auf das bioaktive Molekül.

Erfindungsgemäß behält das zu koppelnde Protein oder Peptid nach seiner Kopplung mindestens 50 % der Ausgangsaktivität bei. In bevorzugten Ausführungsformen beträgt die Aktivität jedoch 60 % oder 70 %, besonders bevorzugt 80 % oder 90 % oder sogar mehr als 90 % seiner Ausgangsaktivität.

Bei der Herstellung eines Konjugates aus bioaktiven Molekülen und zu koppelndem Protein oder Peptid ist es bevorzugt, daß die biologische Aktivität des bioaktiven Moleküles ebenfalls mindestens zu 50 % bestehen bleibt. Bevorzugte Ausführungsformen sehen hier ebenfalls Aktivitäten von 60 oder 70 %, bevorzugt 80, 90 oder mehr als 90 % vor.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die Anwendung jeder Protein-Glutamin: Amin- $\gamma$ -glutamyltransferase. Bevorzugt sind bakterielle Transglutaminase, Pflanzen- oder Säugertransglutaminase. Transglutaminasen sind auch in Mollusken und Krustazeen beschrieben worden und sind wahrscheinlich ubiquitär. Besonders bevorzugt ist die Verwendung einer bakteriellen Transglutaminase. Die am besten charakterisierte bakterielle Transglutaminase ist die Transglutaminase aus *Streptoverticillium mobaraense*.

Im Fall der Durchführung mit Säugertransglutaminase wird bevorzugt die Transglutaminase aus Meerschweinchenleber verwendet. Die bisher untersuchten Säugertransglutaminasen reagieren jedoch schwächer als bakterielle Transglutaminasen und haben teilweise eine höhere Substratspezifität. Ein Beispiel für eine Säugertransglutaminase mit hoher Substratspezifität ist der Blutgerinnungsfaktor XIII<sub>a</sub>.

Die Bedingungen für die Durchführung der Transglutaminase-katalysierten Kopplung richten sich nach der Herkunft der verwendeten Transglutaminase. Bei Verwendung einer bakteriellen Transglutaminase erfolgt die Transglutaminase-katalysierte Verknüpfung eines Proteins oder Peptids mit einem Träger, z.B. einer enzymatisch vernetzten Gelatinefolie (Beispiel 3), bei 20-60°C innerhalb von

24 Stunden in einer gepufferten Lösung bei pH-Werten von 5 bis 9. Die Temperaturen während der enzymatischen Verknüpfung betragen dabei bevorzugt 25 bis 55°C und besonders bevorzugt 30 bis 45 °C. In der am höchsten bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Reaktion bei 37°C oder 37°C  $\pm$  5°C. Die Inkubationszeit bewegt sich bevorzugt zwischen einer halben und 18 Stunden und beträgt besonders bevorzugt zwischen 1 und 4 Stunden. Der pH-Wert der gepufferten Lösung sollte zwischen pH 5 und 9 liegen; bevorzugte Bereiche hängen vom verwendeten Puffersystem ab und liegen für die meisten Puffer bei pH 6 bis 8, besonders bevorzugt pH 7  $\pm$  0,5. Als Puffer können folgende Pufferlösungen verwendet werden:

|                                   |                                      |
|-----------------------------------|--------------------------------------|
| Phosphatpuffer,                   | pH 6,0 - 8,0, bevorzugt pH 6,0 - 7,0 |
| TRIS <sup>1)</sup> -HCl-Puffer,   | pH 7,0 - 9,0, bevorzugt pH 7,0 - 8,5 |
| TRIS-Acetat,                      | pH 6,0 - 9,0, bevorzugt pH 6,0       |
| Tricin <sup>2)</sup> -HCl-Puffer, | pH 7,0 - 9,0, bevorzugt pH 7,5       |
| MOPS <sup>3)</sup> -Puffer,       | pH 6,0 - 8,0, bevorzugt pH 7,5       |
| TEA <sup>4)</sup> -Puffer,        | pH 6,0 - 9,0, bevorzugt pH 7,5       |

Dabei bedeutet:

- <sup>1)</sup> TRIS = Tris(hydroxymethyl)aminomethan
- <sup>2)</sup> Tricin = N-[Tris(hydroxymethyl)methylglycin]
- <sup>3)</sup> MOPS = 3-N-Morpholinopropansulfonsäure
- <sup>4)</sup> TEA = Triethanolamin

Bei Verwendung von bakterieller Transglutaminase aus *Streptoverticillium mobaraense* ist der bevorzugte Puffer Tricin-HCl-Puffer, während das aus Meerschweinchenleber gewonnene Säugerenzym die besten Ergebnisse in TRIS-HCl-Puffer mit EDTA, Dithiotreitol und Calciumionen erbringt.

Die erhaltenen Träger-gekoppelten Proteinimmobilisate weisen eine unerwartet hohe Belegdichte auf. Man erhält beispielsweise ein Gelatine-Protein-A-

Immobilisat mit einer Belegdichte von mindestens 2 ng (50 fmol) Protein A pro  $\text{mm}^2$  Folie, wenn 1  $\mu\text{mol}$  Protein A und 2 g (ca.  $4 \text{ dm}^2$ ) Gelatinefolie in Tris-Acetat-Puffer, pH 6,0, mit 50 nmol bakterieller Transglutaminase für 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert werden (Beispiel 4 und 5). Bei der Berechnung der Belegdichte wurde davon ausgegangen, daß immobilisiertes Protein A noch die maximale Zahl von 2 Antikörpermolekülen der Klasse IgG bindet. Möglicherweise wird aber eine höhere Belegdichte mit diesem Verfahren erreicht.

Erfindungsgemäß kann das zu koppelnde Protein oder Peptid mehr als eine Protein- und/oder Peptidsequenz umfassen. Wie in einem Multienzymkomplex können so mehrere Proteine oder biologisch aktive Peptide auf engstem Raum immobilisiert werden (Multi-Enzymimmobilisat).

Das optimale molare Verhältnis von zu koppelndem Protein oder Peptid zu Träger kann den jeweiligen Bedürfnissen entsprechend jeweils experimentell bestimmt werden. Das Mischungsverhältnis für beide Verbindungen hängt von der Anzahl reaktiver Gruppen, der Molekülgröße und der beabsichtigten Verwendung des Konjugats ab. Üblicherweise beträgt das molare Verhältnis 5:1 bis 1:100 (zu koppelndes Protein oder Peptid zu Träger). Bevorzugte Bereiche sind dabei im Fall einer Kopplung an einen unlöslichen Träger 1:5 bis 1:50.

Zum Herstellen von Konjugaten mit unterschiedlichen biologischen Aktivitäten werden mindestens zwei verschiedene Transglutaminase-Substratmoleküle, idealerweise ein Glutamindonor (Kategorie 1) und ein Glutaminakzeptor (Kategorie 2), mit Transglutaminase bei pH 5-9 und Temperaturen von  $20-60^\circ\text{C}$  inkubiert. Im Fall der Bildung von Träger-Protein-Konjugaten ist das bevorzugte Verhältnis von zu koppelndem Protein oder Peptid zu bioaktivem Molekül 1:20 bis 5:1.

Nach Beendigung der Reaktion kann das Produkt bei Bedarf durch Dialyse, Ultrafiltration, Fällung oder ein chromatographisches Verfahren gereinigt werden.

Zu den Vorteilen des erfindungsgemäßen Verfahrens zählt es, daß die biologische Aktivität der Reaktionspartner in der Regel vollständig erhalten bleibt. Ein weiterer entscheidender Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens gegenüber einer bekannten chemischen Kopplung ist vor allem darin zu sehen, daß durch Trennverfahren die teuren, nicht umgesetzten Ausgangsverbindungen zurückgewonnen werden können. So kann beispielsweise ein Konjugat mit zwei unterschiedlichen biologischen Aktivitäten hergestellt werden, indem man Protein G (ein Protein der Kategorie 2, siehe auch Tabelle 3) mit Soja-Peroxidase (ein Protein der Kategorie 3) im Verhältnis 1:20 mit Transglutaminase vernetzt (Beispiel 7). Eine erfolgreiche Kopplung kann dadurch überprüft werden, daß man Antikörper der Klasse G (IgG), die Protein G spezifisch binden, auf einer Nitrozellulosemembran fixiert, die Testlösung aufbringt und nach mehreren Waschschritten mit 4-Chlor-1-naphthol und Wasserstoffperoxid anfärbt ("Dot-Blot"). Eine quantitative Erfassung der gebildeten Konjugate erfolgt über einen Mikrotiterplatten-Assay (Beispiel 8). Eine Anreicherung bzw. vollständige Reinigung der Protein G-Peroxidase-Konjugate sowie die Rückgewinnung der nicht umgesetzten Ausgangsmaterialien wird durch Chromatographie an einem Anionenaustauscher (Beispiel 9) oder durch Gelpermeationschromatographie erreicht.

Die Erfindung bezieht sich weiterhin auf ein trägergekoppeltes Proteinimmobilisat sowie auf ein Träger-Protein-Konjugat, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind.

Ein bevorzugtes Träger-Protein-Konjugat ist ein durch Transglutaminase katalysierte Kopplung erhaltenes Konjugat aus monoklonalem oder polyklonalem Antikörper und Markerenzym. Bei diesem Markerenzym kann es sich beispielsweise um alkalische Phosphatase, Meerrettichperoxidase oder jedes andere im Stand der Technik bekannte Markerenzym handeln. Dabei erlaubt die Transglutaminase-katalysierte Kopplung die Verbindung eines Antikörpermoleküls mit bis zu 20 Enzymmolekülen, was die Amplifizierung des Signales z.B. bei nachfolgenden

Antigen-Antikörper-Reaktionen erlaubt. Auch durch Vernetzung entstandene oligomere Enzyme verstärken das Signal.

Die Erfindung bezieht sich auch auf die Verwendung eines trägergekoppelten Proteinimmobilisates oder Träger-Protein-Konjugates in der enzymatischen Analyse.

Beispielsweise können die in Tabelle 3 aufgelisteten Substratproteine an einen unlöslichen Träger gekoppelt und zur Etablierung eines neuen Transglutaminase-Aktivitätstests herangezogen werden, insbesondere zur Entwicklung eines spezifischen und sensitiven Analyseverfahrens zur Bestimmung von aktivem Faktor XIII<sub>a</sub> in humanem Blutserum. Dafür wird eine Mikrotiterplatte mit einem guten Transglutaminase-Substrat, z.B. Casein, beschichtet. Noch freie Bindungsstellen wurden mit Rinderserumalbumin abgesättigt. Nach Zugabe eines Enzyms, das über reaktive Glutamin- oder Lysinreste verfügt, z.B. alkalische Phosphatase (Beispiel 6), pipettiert man die Transglutaminaseprobe oder eine Vergleichsprobe zu und inkubiert 0,5 bis 5 Stunden oder auch länger, je nach gewünschter Empfindlichkeit, bei pH 5 bis 9 und Temperaturen von 20-50°C. Der kovalent gebundene Enzymanteil wird nach mehrfachem Waschen über eine colorimetrische Enzymreaktion quantitativ bestimmt, bei alkalischer Phosphatase beispielsweise über die Hydrolyse von para-Nitrophenylphosphat. Bei Verwendung der Substratproteine Protein A und Protein G, Avidin und Streptavidin ist eine zweite Inkubation mit Antikörper-Enzym-Konjugaten bzw. Biotin-Enzym-Konjugaten notwendig, bevor eine Nachweisreaktion durchgeführt werden kann. Dies verbessert die Sensitivität durch eine höhere Enzymkonzentration auf der Mikrotiterplatte, da Protein A und Protein G bis zu 2, Avidin und Streptavidin bis zu 4 Konjugatmoleküle binden können.

Eine Abwandlung des Tests kann darin bestehen, daß die beschichtete Mikrotiterplatte durch eine vernetzte Gelatinefolie ersetzt ist. Diese wird dann in eine Enzymlösung eingetaucht, der nachfolgend die Transglutaminaseprobe zugesetzt

wird. Nach Inkubation und mehrfachem Waschen kann der Gelatinestreifen direkt für die photometrische Messung in einer Küvette verwendet werden.

Weitere erfindungsgemäße Verwendungen sehen die Verwendung als Proteinmodul in oligomerer oder polymerer Form zum Herstellen von Folgeprodukten vor. So können mit dem erfindungsgemäßen Verfahren durch sequenzielle Immobilisierung an Trägern Multi-Enzymimmobilisate hergestellt werden, die beispielsweise bei einer Mehrstufensynthese von organischen oder biologischen Verbindungen eingesetzt werden können. Die erfindungsgemäß hergestellten Multi-Enzymimmobilisate eignen sich auch für diagnostische Anwendungen, beispielsweise für die Bestimmung von Glycerinlipiden nach enzymatischer Freisetzung und Oxidation von Glycerin, und photometrischer Messung der bei dieser Reaktion gebildeten Reduktionsäquivalente.

Die erfindungsgemäßen Proteinimmobilisate und Träger-Protein-Konjugate können auch zum Herstellen von Biosensoren verwendet werden. Für die Biosensortechnik benötigt man stabile bioaktive Verbindungen, die möglichst auf engstem Raum fixiert sind. Aktive Proteinfohlen oder andere aktive unlösliche Proteinkomplexe könnten hierbei Vorteile gegenüber löslichen Enzymen bieten. So könnte beispielsweise ein Biosensor konstruiert werden, dessen Oberfläche mit einem bestimmten Antigen, beispielsweise Hepatitis-B-Oberflächenvirusprotein, belegt ist. Nach Inkontaktbringen des Biosensors mit einer Probe, enthaltend eine unbekannte Konzentration von Antikörpern gegen HbsAg und eine bekannte Konzentration anti-HbsAg-Antikörper-Enzymkonjugat konkurrieren die enzymkonjugierten Antikörper mit den zu bestimmenden Antikörpern um die Bindungsstellen. Nach Besetzung der Bindungsstellen am Biosensor ist ein elektrisches Signal, das durch das Enzym erzeugt wird, umgekehrt proportional zur unbekannten Antikörperkonzentrationen. Der Biosensor kann durch Freisetzen der Antikörper regeneriert werden.



Erfindungsgemäß können die Träger-gekoppelten Proteinimmobilisate beschichtete Mikrotiterplatten mit biologischer Aktivität sein. Weiter können aktive Membranen, Enzymcarrier und analytische Teststreifen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Proteinimmobilisate hergestellt werden. In der Diagnostik und Analytik sind eine Vielzahl von Teststreifen bekannt, die auf der Aktivität eines an dem Teststreifen immobilisierten Enzymes beruhen. Teststreifen finden zunehmend auch im häuslichen Bereich Verwendung. So wurde z.B. in Japan ein Teststäbchen entwickelt, das durch die enzymatische Bestimmung des Kaderinanteils an der Oberfläche von Fisch eine Aussage über dessen Frische erlaubt.

Im folgenden wird die Erfindung anhand der beigefügten Abbildungen und der Beispiele im einzelnen beschrieben.

Dabei zeigt

Abbildung 1 eine Eichgrade für ein Kaninchen-anti-Huhn-IgG alkalische Phosphatasekonjugat,

Abbildung 2 die Bindung von Protein A an eine Gelatinefolie in Abhängigkeit von der Konzentration des Vernetzungsenzyms,

Abbildung 3 die Bestimmung von Transglutaminase durch kovalente Bindung von alkalischer Phosphatase an eine mit Casein beschichtete Mikrotiterplatte und nachfolgender Hydrolyse von Paranitrophenylphosphat, und

Abbildung 4 die Anreicherung von Protein G Peroxidasekonjugaten durch Ionenaustauschchromatographie an Fractogel EDM-TMAE 650 S.

## **Beispiele**

### **Beispiel 1: Erzeugung von bakterieller Transglutaminase**

Transglutaminase wurde aus dem Kulturüberstand von *Streptoverticillium moba-raense*, wie von Gerber et al., Biochem. J. 299, 825-829 (1994), beschrieben, durch Chromatographie an einem stark sauren Ionenaustauscher und Material gereinigt. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese zeigte das Enzym als eine einzelne Bande mit einer spezifischen Aktivität von mehr als 30 E/mg, wenn es im Einklang mit dem von Grossowicz et al., J. Biol. Chem. 187, 111-125 (1950), beschriebenen Verfahren auf Hydroxamatbildung mit CBZ-Glutaminylglycin getestet wurde. Die Proteinkonzentrationen wurden unter Verwendung eines Bicinchoninsäure-Standardprotokolls, wie vom Hersteller beschrieben, bestimmt.

### **Beispiel 2: Identifizierung von Proteinen als Transglutaminase-Substrate**

#### **a) Proteinlösungen**

Die Proteinlösungen der hier beschriebenen Transglutaminase-Substrate werden mit den in Tab. 2 angegebenen Konzentrationen in 0,02 M Natriumphosphatpuffer, pH 7.3, gelöst.

Tabelle 2

| Protein  | Lieferant  | Proteinkonzentration |         | Transglutaminaseaktivität |
|--|------------|----------------------|---------|---------------------------|
|  |            | mg/ml                | nmol/ml |                           |
| Protein A<br>( <i>Staphylococcus aureus</i> )    | Sigma      | 4                    | 95      | 4,7                       |
| Protein G<br>(rekombinant)                       | Sigma      | 2                    | 67      | 5,0                       |
| Avidin<br>(Hühnereiweiß)                         | Sigma      | 1                    | 15      | 5,0                       |
| Streptavidin<br>( <i>Streptomyces avidinii</i> ) | Sigma      | 1                    | 17      | 5,0                       |
| Glucoseoxidase<br>( <i>Aspergillus niger</i> )   | Sigma      | 4                    | 26      | 0,5                       |
| $\beta$ -Galactosidase                           | Sigma      | 2                    | 4       | 4,3                       |
| Peroxidase<br>(Sojabohne)                        | Sigma      | 0,6                  | 16      | 0,6                       |
| Peroxidase<br>( <i>Arthromyces ramosus</i> )     | Sigma      | 2                    | 53      | 0,6                       |
| Lactoperoxidase<br>(Rind)                        | Sigma      | 2                    | 29      | 0,3                       |
| Alkalische<br>Phosphatase<br>(Rind)              | Sigma      | 2                    | 14      | 5,0                       |
| b-Glucuronidase<br>( <i>Escherichia coli</i> )   | Sigma      | 1                    | 15      | 0,6                       |
| Luciferase<br>( <i>Photobacterium fischeri</i> ) | Fluka      | 2                    | 25      | 5,0                       |
| DNase I<br>(Rind)                                | Boehringer | 2                    | 54      | 5,0                       |

b) 22 mM C-DNS-Lösung

22  $\mu$ mol C-DNS (Sigma) werden in 27  $\mu$ l 1 M HCl und 150  $\mu$ l 0,2 M Tris-Acetat-Puffer, pH 6.0, gelöst. Nachfolgend wird mit bidest. H<sub>2</sub>O auf 1 ml aufgefüllt.

c) 4 mM CBZ-Gln-Gly-C-DNS-Lösung

12  $\mu$ mol CBZ-Gln-Gly-C-DNS (Synthese siehe Pasternack *et al.*, Anal. Biochem. 249, 54-60 (1997)) werden in 300  $\mu$ l DMSO gelöst und mit 2.7 ml 0,01 M HCl verdünnt.

d) Transglutaminaselösung

Transglutaminase wird beispielsweise wie in Beispiel 1 beschrieben durch Kultivierung von *Streptovercillium mobaraense* (DSM 40847) gewonnen und durch Ionenaustauschchromatographie nach einem Standardverfahren (Gerber *et al.*, Biochem. J. 299, 825-829 (1994)) angereichert. Die Enzymaktivität wird nach der Methode von Grossowicz *et al.* (J. Biol. Chem. 187, 111-125 (1950)) bestimmt. Die verwendete Enzymmenge ist in Tab. 2 angegeben.

e) Elektrophorese-Auftragspuffer

2 g Harnstoff werden in einer Mischung aus 2 ml 20 % (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 2 ml Glycerin, 2 ml gesättigter Bromphenolblaulösung und 2 ml bidest. H<sub>2</sub>O gelöst.

**f) Reaktionsansätze**

Die Reagenzlösungen werden in der Reihenfolge von Tab. 3 gemischt und nach einer vorgegebenen Inkubationszeit analysiert.

Tabelle 3

| Lösungen  | Reaktionsansatz 1<br>(Glutamindonorproteine) | Reaktionsansatz 2<br>(Glutaminakzeptorproteine) |
|---|--|---|
| Tris-HCl-Puffer, pH 7,0   | 20 µl  | 20 µl   |
| Proteinlösung (Tab. 2)  | 10 µl  | 10 µl   |
| 22 mM C-DNS   | 5 µl   | -   |
| 4 mM CBZ-Gln-Gly-C-DNS  | -  | 5 µl  |
| Mischen, die Reaktion starten durch Zugabe von  |  |   |
| Transglutaminase (Tab. 2)   | 5 µl   | 5 µl  |
| Inkubieren für 60 min bei 37 °C und anschließend Denaturieren durch Zugabe von 10 µl Auftragspuffer und Erhitzen für 5 min auf 80 °C. |  |   |

**g) Analytik**

Jede Probe wird nach der Methode von Laemmli (Nature 227, 680-685 (1970)) auf 12,5 %igen Polyacrylamidgelen mit 5 %igen Obergelen elektrophoretisch aufgetrennt und vor der Silberfärbung nach der Methode von Blum *et al.* (Electrophoresis 8, 93-99 (1987)) mit UV-Licht der Wellenlänge 366 nm untersucht. Einige Ergebnisse sind in Tab. 1 (s.o.) aufgeführt.

**Beispiel 3: Herstellung einer hitzestabilen Gelatinefolie**

2 g Gelatine mit einer Gallertfestigkeit von 250-300 g Bloom werden mit 8 g H<sub>2</sub>O übergossen und nach 30 min bei 60 °C gelöst. Die auf 50 °C abgekühlte Gelatinelösung wird mit Transglutaminase (0,5 E/g Gelatine) versetzt und sofort in eine

Foliengießvorrichtung (Folienmaschine oder Gießkammer) übergeführt. Nach 30 min wird die erstarrte Folie abgelöst und an der Luft über Nacht getrocknet.

#### **Beispiel 4: Herstellung einer Gelatinefolie mit Protein-A-Aktivität**

Eine vernetzte Gelatinefolie (2 g Trockenmasse) wird in 70 ml 0,2 M Tris-Acetat-Puffer, pH 6,0, auf 37 °C erwärmt. Nach Zugabe von 10 ml 10 mM Protein A in 0,2 M Tris-Acetat-Puffer, pH 6,0, und 20 ml Transglutaminase der Aktivität 4 E/ml inkubiert man 60 min bei 37 °C. Anschließend wird die Folie zweimal mit 100 ml Tris-Acetat-Puffer, pH 6,0, gewaschen, an der Luft getrocknet und in Streifen (ca. 2 mg) geschnitten.

#### **Beispiel 5: Ermittlung der Protein-A-Aktivität**

##### **a) Eichkurve für ein Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugat**

Ein Kaninchen-anti-Huhn-Antikörper (IgG) konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (Sigma) wird mit 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 8,0, der zusätzlich 150 mM NaCl, 0,005 % (v/v) Tween 20 und 0,09 % (w/v)  $\text{NaN}_3$  enthält (AK-Bindungspuffer), 1:2000 bis 1:10000 verdünnt. Mit jeder Verdünnung wird eine Farbreaktion nach dem Schema von Tab. 4 durchgeführt. Die Eichgerade zeigt Abb. 1.

Tabelle 4

| Reagenzien   | Analysenansatz | Vergleichsansatz |
|--|----------------|------------------|
| 1 M Diethanolamin-HCl-Puffer mit 0,01 mM MgCl <sub>2</sub> und 0,2 % (w/v) NaN <sub>3</sub> , pH 9,8 | 400 µl         | 401 µl           |
| p-Nitrophenylphosphat  | 10 mg          | 10 mg            |
| Lösen, die Reaktion starten durch Zugabe von   |                |                  |
| Konjugat-Verdünnung  | 1 µl           | -                |
| Inkubieren für 20 min bei Raumtemperatur, Abbruch der Reaktion durch Zugabe von                      |                |                  |
| 3 N NaOH   | 100 µl         | 100 µl           |
| bidest. H <sub>2</sub> O   | 500 µl         | 500 µl           |
| Ermittlung der Extinktion bei 405 nm.  |                |                  |

**b) Protein-A-Nachweis**

Ein 2-mg-Streifen des Gelatine-Protein-A-Immobilisats wird zum Quellen 30 min in AK-Bindungspuffer gelegt. Das gut abgetropfte Aliquot wird in 100 µl einer 1:2000-Verdünnung des Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugats übergeführt und 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit AK-Bindungspuffer wird die Farbreaktion nach dem Schema von Tab. 4 durchgeführt. Für den Vergleichsansatz dient eine vernetzte Gelatinefolie ohne Protein A. Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der Protein A-Belegdichte von der Konzentration des Vernetzungsenzyms.

**Beispiel 6: Mikrotiterplatten-Assay zum Nachweis von Transglutaminase****a) Nicht-kovalente Bindung von Casein**

In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol werden 250 µl einer Caseinlösung (1 mg/ml in Beschichtungspuffer bestehend aus 40 mM Tris-HCl mit 150 mM NaCl, pH 8,3) pipettiert. Die Mikrotiterplatten werden über Nacht bei 4 °C

inkubiert und verbliebene Bindungsstellen mit 250 µl einer 1 % (w/v) Rinder-serumalbumin-Lösung in Beschichtungspuffer abgesättigt.

#### b) Spezifische Transglutaminase-Reaktion

In jede Vertiefung pipettiert man 20 µl einer Probe oder Vergleichsprobe (z. B. nur den verwendeten Puffer ohne Transglutaminase) und 20 µl einer Alkalische-Phosphatase-Lösung (67 µg/ml in Beschichtungspuffer) und inkubiert 120 min bei Raumtemperatur. Anschließend wird dreimal mit Substratpuffer für Alkalische Phosphatase, bestehend aus 1 M Diethanolamin-HCl-Puffer mit 0,01 mM  $MgCl_2$ , pH 9,8, gewaschen.

#### c) Farbreaktion

100 µl einer Substratlösung aus para-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer (2 mg/ml) werden in jede Vertiefung pipettiert, und nach 30 min wird die optische Dichte bei 405 nm (Abb. 3) bestimmt.

#### Beispiel 7: Herstellung eines Protein-G-Peroxidase-Konjugats

Sojabohnen-Peroxidase und Protein G werden in einem molaren Verhältnis von 20:1 in 0,3 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,0, gelöst. Nach Zugabe von Transglutaminase (0,5 E/mg Protein) wird 18 h bei 37 °C inkubiert.

#### Beispiel 8: Quantitativer Nachweis eines Protein G-Peroxidase-Konjugats

##### a) Nichtkovalente Bindung von Kaninchen-Antikörper

In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol werden 100 µl einer Lösung aus 10 µg Kaninchen-Antikörper (IgG, Sigma) in 1 ml Beschichtungspuffer, bestehend aus 40 mM Tris-HCl mit 150 mM NaCl, pH 8,3, pipettiert. Die Mikroti-



terplatte wird 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, entleert und verbleibende Bindungsstellen mit 200 µl einer 1 % (w/v) Rinderserumalbumin-Lösung in Beschichtungspuffer abgesättigt. Nachfolgend wird dreimal mit 200 µl Beschichtungspuffer gespült.

#### b) Spezifische Bindung des Konjugats

In jede Vertiefung werden 100 µl einer Probe oder Vergleichsprobe (z. B. Konjugatansatz ohne Transglutaminase) pipettiert und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird erneut dreimal mit 200 µl Beschichtungspuffer gespült.

#### c) Farbreaktion

Eine Substratlösung wird hergestellt aus 2 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6,0, 2 ml einer 5 % (w/v) Pyrogallol-Lösung in H<sub>2</sub>O, 1 ml 0,05 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung und 13 ml H<sub>2</sub>O. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte werden 100 µl der Substratlösung pipettiert, und nach 30 min wird die Extinktion bei 405 nm gemessen.

#### Beispiel 9: Anreicherung eines Protein-G-Peroxidase-Konjugats und Rückgewinnung der Ausgangsmaterialien

Eine 10x150 mm Ionenaustauschersäule gefüllt mit Fractogel-EMD-TMAE-650 S (Merck) wird mit dem fünffachen Bettvolumen an 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert. 1 ml einer Protein-G-Peroxidase-Konjugatmischung wird auf die Säule gepumpt, und die nicht-bindenden Proteine (Transglutaminase und Protein G in dieser Reihenfolge) werden mit Äquilibrierpuffer von der Säule gespült. Anschließend werden die Konjugate durch lineare Erhöhung der Ionenkonzentration mit NaCl von 0 bis 0,15 M innerhalb von 60 min eluiert. Die höchsten Konjugatkonzentrationen finden sich in Fraktionen bei 0,08-0,12 M NaCl (Abb. 4).

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Transglutaminase-katalysierten Koppeln von Protein oder Peptid an einen Träger unter Erhalt von mindestens 50 % der biologischen Aktivität des Proteines oder Peptides, wobei der Träger ein bioaktives Molekül oder eine vorgegebene unlösliche Matrix ist, umfassend den Schritt des Inkontaktbringens des Trägers mit dem zu koppelnden Protein oder Peptid und mit Transglutaminase, wobei der Träger und das Protein als Acyl- und/oder Amindonor wirken und als Transglutaminasesubstrate geeignet sind.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zu koppelnde Protein oder Peptid ein Glutamindonor ist und der Träger reaktive Amingruppen umfaßt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zu koppelnde Protein oder Peptid ein Glutaminakzeptor ist und der Träger reaktive Carboxamidgruppen enthält.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das zu koppelnde Protein oder Peptid ein Glutamindonor und -akzeptor ist und der Träger reaktive Amin- und/oder Carboxamidgruppen enthält.
5. Verfahren nach Anspruch 2 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktiven Amingruppen des Trägers reaktive Lysinseitenketten sind.
6. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß die reaktiven Carboxamidgruppen des Trägers reaktive Glutaminseitenketten sind.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein bioaktives Molekül ist und in Lösung vorliegt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger eine unlösliche Matrix ist und die unlösliche Matrix Protein enthält.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger Gelatine oder Casein ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß das zu koppelnde Protein oder Peptid ein natives, ein rekombinantes oder ein synthetisches, modifiziertes oder unmodifiziertes Peptid ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ein natives rekombinantes, synthetisches, modifiziertes oder unmodifiziertes Protein oder Peptid ist.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß das zu koppelnde Protein oder Peptid nach seiner Kopplung mindestens 60, bevorzugt 70, besonders bevorzugt 80 oder 90 % oder mehr als 90 % seiner Ausgangsaktivität aufweist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 7 und 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß das bioaktive Material nach der Kopplung mindestens 50 % seiner Ausgangsaktivität aufweist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das bioaktive Material nach der Kopplung mindestens 60 %, bevorzugt 70%, besonders bevorzugt 80 % oder 90% oder mehr seiner Ausgangsaktivität aufweist.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Transglutaminase eine bakterielle Transglutaminase, eine Pflanzentransglutaminase oder eine Säugertransglutaminase ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die bakterielle Transglutaminase aus *Streptoverticillium* erhalten worden ist.
17. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es bei pH 5 bis 9 durchgeführt wird.

18. Verfahren nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß es bei einer Temperatur von 20°C bis 60°C durchgeführt wird.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das zu koppelnde Protein oder Peptid mehr als eine Proteinspezies umfaßt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis von zu koppelndem Protein oder Peptid zu Träger 5:1 bis 1:100 beträgt.
21. Trägergekoppeltes Proteinimmobilisat, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, 8 bis 12 und 15 bis 20.
22. Träger-Protein-Konjugat, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und 10 bis 20.
23. Verwendung eines trägergekoppelten Proteinimmobilisates oder Träger-Protein-Konjugates in der enzymatischen Analyse oder für Immundiagnostiktests.
24. Verwendung eines trägergekoppelten Proteinimmobilisates nach Anspruch 20 oder Träger-Protein-Konjugates nach Anspruch 22 als Proteinmodul in oligomerer oder polymerer Form zum Herstellen von Folgeprodukten oder in der Diagnostik.
25. Verwendung nach Anspruch 24 zum Herstellen von Biosensoren, beschichteten Mikrotiterplatten mit biologischer Aktivität, aktiven Membranen, Enzym-Carriern, Analytikteststreifen.

1/2

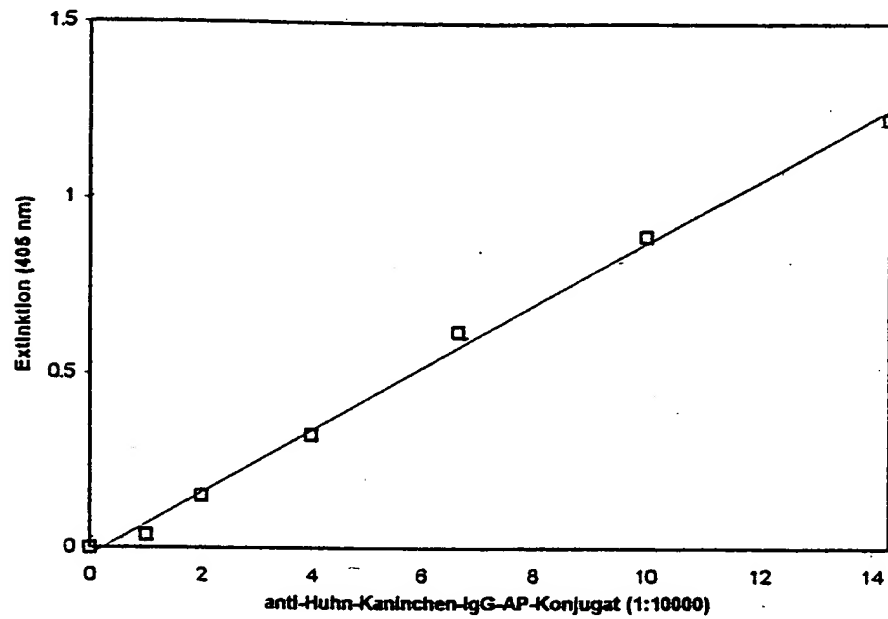
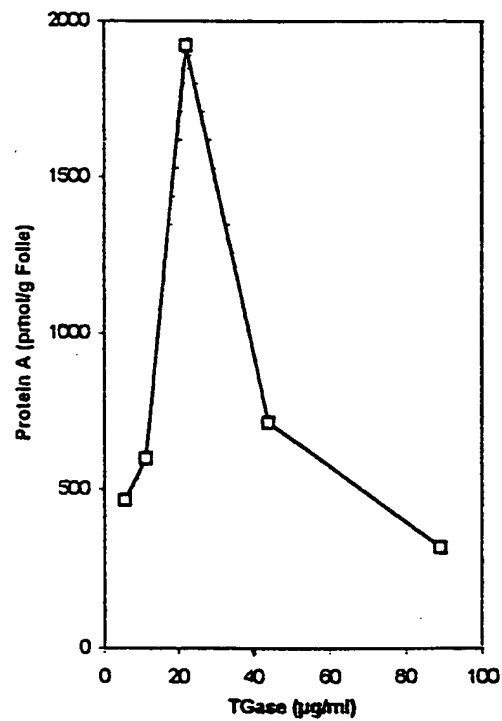
Abb. 1: Eichgerade für ein *anti*-Huhn-Kaninchen-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat

Abb. 2: Bindung von Protein A an eine Gelatinefolie in Abhängigkeit von der Konzentration des Vernetzungsenzyms.



2/2

Abb. 3. Bestimmung von Transglutaminase durch kovalente Bindung von Alkalischer Phosphatase an eine mit Casein beschichtete Mikrotiterplatte und nachfolgender Hydrolyse von *para*-Nitrophenylphosphat.

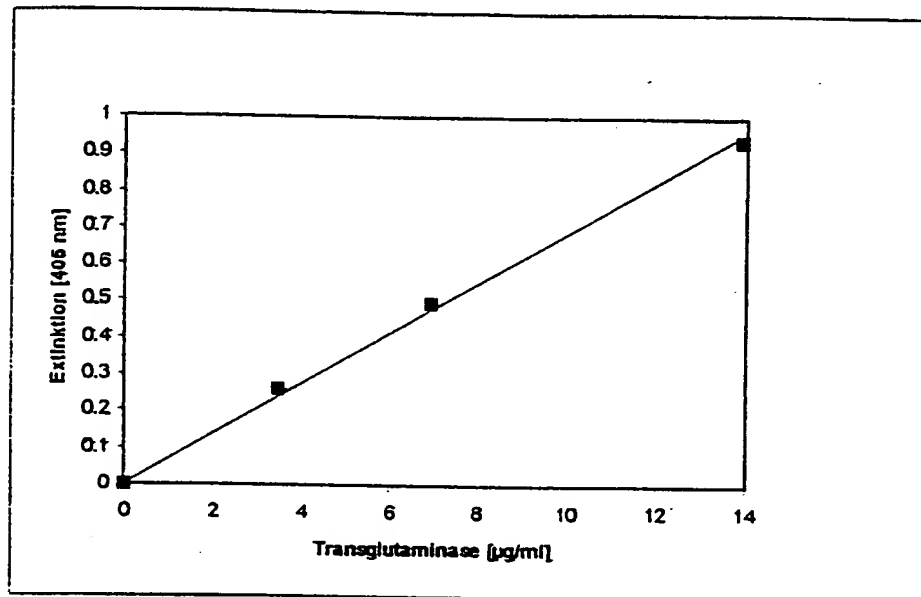


Abb. 4. Anreicherung von Protein G-Peroxidase-Konjugaten durch Ionenaustauschchromatographie an Fractogel-EDM-TMAE 650 S. Die aktiven Konjugatfraktionen sind durch Querbalken hervorgehoben.

